

09/806158

PCT/JPGO/06359

18.09.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6359

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月17日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第264474号

REC'D 06 NOV 2000

WIPO

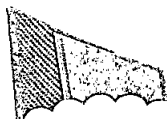
PCT

出願人

Applicant(s):

持田製薬株式会社

EJU



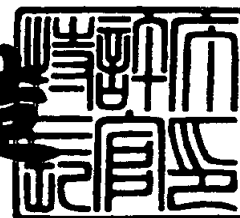
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085376

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 MD0504  
 【提出日】 平成11年 9月17日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 G01N 33/68  
 【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7 番地

持田製薬株式会社

内

【氏名】 古迫 正司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7 番地

持田製薬株式会社

内

【氏名】 白川 嘉門

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080159

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

---

【物件名】 要約書 1

【物件名】 (FERMP-17209) 受託証の謄本 1

【物件名】 (FERMP-17350) 受託証の謄本 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗 C D 1 4 抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高分子量の C D 1 4 蛋白質に結合し、低分子量の可溶型 C D 1 4 蛋白質には結合しない抗体。

---

【請求項 2】

高分子量の C D 1 4 蛋白質の C 末端 4 1 アミノ酸部分のいずれかに結合する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

C 末端 4 1 アミノ酸部分のいずれかが配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目から 3 2 8 番目のアミノ酸配列または 3 3 1 番目から 3 4 5 番目のアミノ酸配列である請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

高分子量の C D 1 4 蛋白質に結合し、配列番号 1 に記載の C D 1 4 蛋白質の 1 番目から 3 1 5 番目のアミノ酸部分には結合しない請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の抗体を使用することを特徴とする高分子量の C D 1 4 蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高分子量の C D 1 4 蛋白質の C 末端部に特異的に結合性を有する抗体、それを産生する細胞及び該抗体の用途に関する。

具体的には、高分子量の C D 1 4 蛋白質配列のうち 3 1 6 番目のグリシンより 3 5 6 番目のアラニンまでの領域のいずれかに対するモノクローナル抗体及びそ

れを産生するハイブリドーマに関する。本発明はさらに、該モノクローナル抗体を用いる高分子量のCD14蛋白質の免疫学的測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

1990年、Wrightらは単核球の膜上に発現されているCD14と命名された53kDaの糖蛋白質が、エンドトキシンであるLPSのレセプターであることを明らかにした(Science, 249巻, 1431頁, 1990年)。このCD14には、膜結合型CD14蛋白質と血中や尿中に存在する可溶型CD14蛋白質があり、可溶型CD14蛋白質は主に2種類の分子量の異なるアイソフォームとして血中に放出されることも明らかになった。特に可溶型CD14蛋白質は敗血症患者や外傷患者、火傷患者、リウマチ患者血清や尿で増加することが報告されLPS(リポ多糖)の排除やLPSシグナル伝達に関与していると考えられている。また、Landmannらは、敗血症患者血清の可溶型CD14蛋白質のウェスタン分析を行い、高分子量の可溶型CD14蛋白質が敗血症死亡例や発作性夜行性ヘモグロビン尿症(PNH)患者で高値であり、また正常血清中には敗血症死亡例で検出された高分子量の可溶型CD14蛋白質は検出されなかったことを報告している(The Journal of Infectious Disease, 171巻, 639頁, 1995年)。この分子量の異なるサブタイプについては、糖鎖の違いが関与していること、またNおよびO結合型糖鎖を除去してもなお2種の異なる分子量の可溶型CD14蛋白質が血中に存在することをStelzerらが報告している(Eur. J. Biochem. 236巻, 457頁, 1996年)。またBuflerらは可溶型CD14蛋白質のC末端分析を行い可溶型CD14蛋白質の327番のセリン残基にGPI基が結合すること、約56kDaの分子量を持つ可溶型CD14蛋白質はGPIアンカリングされない分子種であることを報告している(Eur. J. Immunol., 25巻, 604頁, 1995年)。

【0003】

上記したように、これまでの報告から高分子量の血中可溶型CD14蛋白質サブタイプは、直接血中に放出されたGPIアンカリングされていないCD14蛋

白質であり、敗血症患者重症血清で高値となることが分かっている。しかしながら、これらの解析はウエスタン法によるものであり、複雑な操作過程が必要な上、感度も高くないため、実用的でないという問題点があった。

すなわち、直接血中に放出された高分子量のCD14蛋白質が何らかの生理的意義があると考えられているが、高感度で簡便な特異的測定法が存在しないために高分子量のCD14蛋白質測定の臨床上の有用性を証明することができていない。これらの解明には、高感度、簡便かつ特異的な測定法の開発が必要であり、特に高分子量のCD14蛋白質の特異的測定法の開発が必須である。

#### 【0004】

CD14蛋白質に対する抗体はBazilらの作製したMEM-18 (Eur. J. Immunol., 16巻、1583頁、1986年)、Shuttらの作製したRoMo-1 (Allerg. Immunol. (Leipz), 34巻、1号、17頁、1988年)、Steinmanらの作製した3C10 (J. Exp. Med., 158巻、1号、126頁、1983年)をはじめ、多くの抗CD14蛋白質抗体が作製されている。さらに、3C10及びMEM-18は、LPSがCD14蛋白質に結合するのを阻害する活性をもつことも明らかになっており、それぞれの結合領域がアミノ末端側、すなわちLPSの結合領域である配列番号1に記載の7~14番目 (J. Biol. Chem., 270巻、29号、17237頁、1995年)、及び57~64番目 (J. Biol. Chem., 270巻、10号、5219頁、1995年)のアミノ酸に存在することが報告されている。また、これら抗体を用いた可溶型CD14蛋白質の測定系も作製され (J. Immunol. Methods, 155巻、225頁、1992年) ている。しかしながら、報告されているCD14蛋白質に対する既存の抗体には高分子量のCD14蛋白質のC末端側を特異的に認識する抗体はない。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、高分子量のCD14蛋白質の特異的抗体を提供することである。またこの抗体を用いて、高分子量のCD14蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に定性または定量する測定方法を提供することである。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は鋭意研究の結果、配列番号 1 に記載の高分子量の CD 1 4 蛋白質を特異的に認識する抗体、その抗体のエピトープとなり得るポリペプチド、その抗体を産生するハイブリドーマ、その抗体を用いた高分子量の CD 1 4 蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に定性または定量する測定方法、及びその測定方法を用いた高分子量の CD 1 4 蛋白質が関与している疾病の診断方法を開発し、本発明を完成した。

【0 0 0 7】

すなわち、本発明は、以下の下記の抗体、ハイブリドーマ、測定方法である。

- (1) 高分子量の CD 1 4 蛋白質に結合し、低分子量の可溶型 CD 1 4 蛋白質には結合しない抗体。
- (2) 高分子量の CD 1 4 蛋白質の C 末端 4 1 アミノ酸部分のいずれかに結合する (1) に記載の抗体。
- (3) C 末端 4 1 アミノ酸部分のいずれかが配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目から 3 2 8 番目のアミノ酸配列または 3 3 1 番目から 3 4 5 番目のアミノ酸配列である (2) に記載の抗体。
- (4) 高分子量の CD 1 4 蛋白質に結合し、配列番号 1 に記載の CD 1 4 蛋白質の 1 番目から 3 1 5 番目のアミノ酸部分には結合しない (1) ~ (3) のいずれかに記載の抗体。
- (5) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗体を産生するハイブリドーマ。
- (6) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗体を使用することを特徴とする高分子量の CD 1 4 蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法。

【0 0 0 8】

【発明の実施の形態】

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の第一の態様は高分子量の CD 1 4 蛋白質に結合し、低分子量の可溶型 CD 1 4 蛋白質には結合しない抗体である。高分子量の CD 1 4 蛋白質とは、CD 1 4 蛋白質の N 末端シグナルペプチドがプロセッシングされ、細胞外に分泌もし

くは表出されたCD14蛋白質であり、配列番号1に記載の356アミノ酸残基からなる蛋白質及び、その蛋白質から40アミノ酸以下のC末端がプロセシングされた蛋白質である。また、配列番号1に記載の356アミノ酸残基からなる蛋白質からさらにC末端41アミノ酸以上がプロセシングされた蛋白質が、低分子量の可溶型CD14蛋白質である。

#### 【0009】

GarnierらのGOR IV法 (Methods in Enzymology, 266巻, 540頁, 1996年) を用いて、human CD14蛋白質の2次構造予測を行った結果、312-314番目のアミノ酸残基および329-330番目のアミノ酸残基において $\beta$ シートを形成している可能性が示唆された。さらにhuman、bovine、rabbit、mouseおよびratの5種類のCD14蛋白質のアミノ酸配列をCLUSTALWのmultiple alignmentを行った結果、315番目から329番目のアミノ酸が欠損していた。種間で配列が保存されていないことと前者の構造予測から315番目のプロリンから328番目のグリシンまでのペプチド部分はループを形成している可能性があり、蛋白分解酵素の感受性が高い構造であると考えられた。すなわち、CD14蛋白質はこの部分で分解され低分子量CD14蛋白質として血中に放出されることが考えられる。

#### 【0010】

この高分子量のCD14蛋白質の代表的なアミノ酸配列は配列番号1に示している。すなわち、本発明の第一の態様の抗体はこの配列のC末端に結合する抗体が好ましく、C末端41アミノ酸部分のいずれかに結合する抗体がより好ましい。さらに、C末端41アミノ酸部分以外の部分には結合しないことが好ましい。配列番号1に記載の316番目から328番目のアミノ酸配列または331番目から345番目のアミノ酸配列は、高分子量のCD14蛋白質に存在し、低分子量の可溶型CD14蛋白質に存在しないアミノ酸配列であり、この配列が本発明の抗体のエピトープとなっていることがさらに好ましい。また、配列番号1に記載の316番目から356番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体も本発明の抗体に含まれ、さらに316番目から328番目のアミノ酸配列ま



たは 3 3 1 番目から 3 4 5 番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体も本発明の抗体に含まれる。

【0 0 1 1】

図 2 の結果からは配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目から 3 2 8 番目のアミノ酸またはその一部を認識する抗体は、高分子量中のより短い C D 1 4 蛋白質も認識するので分子種の分別に適し、一方、図 5 及び図 6 の結果からは敗血症患者と正常人との重複部分のない配列番号 1 に記載の 3 3 1 番目から 3 4 5 番目のアミノ酸またはその一部を認識する抗体は、診断方法に適していることがわかる。

【0 0 1 2】

本発明の抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。高分子量の C D 1 4 蛋白質を特異的に検出するためには、ある限られたエピトープに対する抗体を使用することが望ましいため、モノクローナル抗体が好ましい。また分子種は特に限定されない。いずれのクラス、サブクラス及びイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。また高分子量の C D 1 4 蛋白質に結合し、低分子量の可溶型 C D 1 4 蛋白質には結合しない限り、抗体断片も本発明に含まれる。

【0 0 1 3】

本発明の抗体は公知技術を用いることにより作製できる。例えば、モノクローナル抗体は下記の方法で作製できる。配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列の全部または一部を有するポリペプチドを免疫原として免疫した哺乳動物の免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、これより高分子量の C D 1 4 蛋白質と結合し、低分子量の可溶型 C D 1 4 蛋白質を結合しないクローンを選択し、抗体を作製する。

【0 0 1 4】

ポリペプチドは、市販のペプチド合成機を用いて調製することができる。免疫する哺乳動物は、特に限定されないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットまたはハムスター等が好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これには P 3、P 3 U 1、S P 2 / O、N S - 1、Y B 2 / O 及び Y 3 - A g 1, 2, 3

等の骨髓種細胞が含まれる。免疫は公知の方法により行なうことができる。例えば、抗原を腹腔内、皮下、静脈内またはフットパッド内に投与して行なう。この抗原の投与はアジュバントを併用してもよく、また複数回投与することが好ましい。免疫細胞は抗原の最終投与の数日後、例えば3日後、に摘出した脾細胞またはリンパ節由来の細胞が好ましい。免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、Milstein等の方法 (Methods in Enzymol.、73巻、3頁) 等の公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール (PEG) を使用する方法または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、免疫細胞に対し、ミエローマ細胞を1/10量〜等量を使用することが好ましい。細胞融合をPEG (平均分子量1,000〜4,000) を使用して行なう方法ではPEG濃度は特に限定されないが50%で行なうことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド (DMSO) 等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1〜5分間反応後、培地を添加することにより終了する。この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを含む培地 (HAT培地) 等の選択培地で1日〜7日間培養し、未融合細胞と分離する。得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単一クローン化し、単一クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。例えばELISA法、凝集反応法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。また、ハイブリドーマをこれと適合性を有する哺乳動物に投与して増殖し、その腹水より得ることができる。抗体の精製は、塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法またはアフィニティークロマト法等の公知の精製手段を用いて行なうことができる。

【0015】

本発明の抗体の好適な例として、ラットに高分子量のCD14蛋白質より選択

した13～15アミノ酸のペプチドを抗原として免疫した免疫細胞とミエローマ細胞を細胞融合して取得したハイブリドーマF1033-3-1が産生するF1033-3-1抗体、またはF1025-3-1が産生するF1025-3-1抗体が挙げられる。

【0016】

本発明の第二の態様は本発明の第一の態様の好ましい例であるF1033-3-1抗体またはF1025-3-1抗体を産生するハイブリドーマである。

本発明のハイブリドーマは本発明の第一の態様に記載した方法により作製することができる。

本発明のハイブリドーマは平成11年2月9日付け（受託番号P-17209）または平成11年3月30日付け（受託番号P-17350）で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

【0017】

本発明の第三の態様は本発明の第一の態様の抗体を使用することを特徴とする高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法である。

【0018】

本発明の第一の態様である高分子量のCD14蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない抗体を使用して、検体中の高分子量のCD14蛋白質を他の低分子量の可溶型CD14蛋白質と分別して、高感度、簡便かつ特異的に定性または定量することができる。この高分子量のCD14蛋白質の代表的なポリペプチドは配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

本発明の測定法における被検物質の検出原理は特に限定されないが、凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等が例示される。この中でも、サンドイッチ法及び競合法が好ましく、特にサンドイッチ法が好ましい。

凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球（例えば羊赤血球）の表面に結合させて、被検物質が存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標として高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

また、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ケミルミネッセンスイムノアッセイ（化学発光免疫測定法）、フルオロイムノアッセイ（蛍光免疫測定法）、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）、イムノクロマトグラフィーアッセイ（ICA）等の原理で測定を行うことができる。

#### 【0019】

固相直接法では、検体（試料）を直接固相に吸着させ、固相の高分子量のCD14蛋白質非吸着面を、その測定系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理し、次いで高分子量のCD14蛋白質を認識する酵素標識抗体を添加し、反応させる。以降は、サンドイッチ法と同様の操作を行ない、検体中の高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

競合法では、使用する抗体が認識する一定量の高分子量のCD14蛋白質を直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理した後、ここに、高分子量のCD14蛋白質を認識する酵素標識抗体と検体（試料）とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色物質を加えて酵素と反応させる。検体添加による、酵素標識抗体の固相の高分子量のCD14蛋白質への結合阻害度を測定することにより、検体中の高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

なお、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識した高分子量のCD14蛋白質を検体と同時に添加し、検体添加による標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、検体中の高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量してもよい。

上記以外の方法として、抗原抗体反応を液相中で行ない、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的な手法によって、標識抗体と結合した高分子量のCD14蛋白質を分離し、高分子量のCD14蛋白質を特異的に定性または定量

する方法もある。また、高分子量のCD 1 4 蛋白質を認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行なわせて、高分子量のCD 1 4 蛋白質を特異的に定性または定量することも可能である。

本発明の測定方法は、以上説明したように、試料中の高分子量のCD 1 4 蛋白質を特異的に定性または定量することを目的としている。この場合、対象試料は動物、特にヒトの体液あるいは、組織、細胞および菌体ならびにそれらの抽出液、培養上清、塗末標本および切片があげられるが、体液であることが好ましい。より好ましくは、血液、血漿、血清、尿、髄液、リンパ液、唾液、腹水、胸水より選ばれる試料である。

#### 【0020】

本発明の抗体を使用し、本発明の測定方法を応用することにより、CD 1 4 蛋白質関連疾患の診断に用いることが可能である。CD 1 4 蛋白質関連疾患には高分子量のCD 1 4 蛋白質関連疾患、低分子量の可溶型CD 1 4 蛋白質関連疾患または全てのCD 1 4 蛋白質関連疾患が含まれる。これらの疾患には敗血症、関節リウマチ、AIDS、自己免疫疾患、溶血性貧血、腫瘍、アトピー性疾患、アレルギー疾患、サルコイドーシス、マラリア、乾癬が含まれる。この中でも、正常人と患者により高分子量のCD 1 4 蛋白質の血清値が異なることが実施例に記載した敗血症が好ましく例示される。

#### 【0021】

診断は、本発明の測定方法を使用して、CD 1 4 蛋白質関連疾患患者の血清、尿または体液中の、あるいは培養上清中の、高分子量のCD 1 4 蛋白質、他の可溶型CD 1 4 蛋白質及び全てのCD 1 4 蛋白質濃度を測定した値を、予め同方法を使用して測定し、標準化した正常人の値または正常人の値の範囲と比較することにより行なう。また、予め、疾患または臨床症状により高分子量のCD 1 4 蛋白質、他の可溶型CD 1 4 蛋白質及び全ての可溶型CD 1 4 蛋白質濃度の値またはその範囲を標準化した後に行なうことが好ましい。

#### 【0022】

また、本発明の抗体を含むことを特徴とする高分子量のCD 1 4 蛋白質関連疾

患の診断試薬またはキットを作成することも可能である。この診断試薬またはキットには本発明の抗体が含まれる。また、キットの構成要素として抗体以外に測定用プレート例えばペプチド固相化プレート、抗体検出用標識抗体例えばペルオキシダーゼ標識抗ヒト I g G 抗体、発色液例えば T M B 溶液が含まれる。その他このキット中に含むものは前述した測定系の測定結果を阻害するものでなければ限定されない。診断試薬またはキットの使用方法は前述した測定方法に準拠する。

### 【 0 0 2 3 】

#### 【実施例】

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。また、アミノ酸配列のアミノ酸の番号は配列表の配列番号 1 に記載の番号を記載した。

### 【 0 0 2 4 】

#### 実施例 1 高分子量の C D 1 4 蛋白質に特異的なペプチドの作製

アミノ酸配列検索ソフト D N A S I S (日立ソフトエンジニアリング) を用いてヒト C D 1 4 配列、サル C D 1 4 配列、マウス C D 1 4 配列、ラット C D 1 4 配列のホモロジー解析を行ったところ、ヒト/サルのホモロジーは 9 4 %、ヒト/マウスでは 6 5 %、ヒト/ラットでは 6 3 %であった。次に高分子量の C D 1 4 蛋白質に特異性を有する抗体を作製するため、配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目のグリシンより 3 5 6 番目のアラニンの間 (以下 C 末 4 1 アミノ酸と記載) のホモロジー解析を行ったところ、ヒト/マウスでは 4 4 %、ヒト/ラットでは 4 6 %であった。この領域でのホモロジーが 4 4 ~ 4 6 %であったことから、マウス、ラットにこの領域に対する特異抗体を産生させられると考え、以下の解析を行った。C h o u - F a s m a n 及び R o b s o n の 2 次構造予測プログラムを用いて解析を行ったところ、C 末 4 1 アミノ酸のうち 3 1 6 番目から 3 2 8 番目の配列はコイル構造を有しており抗体を作製する上で優れたエピトープになり得ると考えられた。また、3 3 1 番目から 3 4 5 番目の配列は疎水性アミノ酸が占め

る割合が 6 9 % と高い結果であったが、構造的には  $\beta$  構造の中に一部ターン構造を有するコンビネーション構造を取ることが予想されたため、何らかの条件においてはタンパク表面に露出されているものと考え、免疫が可能と判断した。これらのことより配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目から 3 2 8 番目の配列及び 3 3 1 番目から 3 4 5 番目の配列を、免疫に使用する高分子量の CD 1 4 特異的なペプチド（以下、ペプチド 1 3 及びペプチド 1 5 と記載）として選択した。

#### 【 0 0 2 5 】

なお、選択したペプチドを C 末端で SH 基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、C 末端にシステインを挿入した。ペプチドの合成は A B I 4 3 2 A ペプチド合成機（アプライド）を用いて行った。定法により樹脂よりペプチドの切り出し、C 1 8 逆相 HPLC（CAPCELL-PAK、資生堂）を用いてペプチドを精製した。

#### 【 0 0 2 6 】

#### 実施例 2 合成ペプチドを用いたペプチドキャリア抗原の作製

実施例 1 で作製したペプチドを蒸留水で 1 0 m g / m L に溶解し、1 0 m g / m L のマレイミド化キーホールリンペットヘモシアニン（KLH、PIERCE）と等量混合した。室温で 2 時間反応後、NAP-1 0 カラム（ファルマシア）で脱塩しペプチド 1 3 キャリア抗原（以下、ペプチド 1 3 - KLH と記載）、ペプチド 1 5 キャリア抗原（以下、ペプチド 1 5 - KLH と記載）を得た。蛋白質濃度は使用した KLH 量を液量で割ったものを用いた。

#### 【 0 0 2 7 】

#### 実施例 3 組換えヒト CD 1 4 蛋白質発現プラスミドの構築

##### （1）ヒト CD 1 4 蛋白質哺乳細胞発現プラスミドの構築

ヒト CD 1 4 蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、発現プラスミド（pM1 6 5 0）の構築を行った。すなわち特許国際公開公報 WO 9 8 / 3 9 4 3 8 に記載の pUCH1 4 P-4 より Xba I および Hind III で切断した遺伝子断片を p cDNA 3. 1（-）（Invitrogen 社）の Xba I / Hind III サイトに定法に従い挿入し大腸菌 JM1 0 9（宝酒造）に形質転換し、定法によりクローニングを行い pM1 6 5 0 を得た。

【0028】

(2) 可溶型ヒトCD14蛋白質変異体哺乳細胞発現プラスミドの構築

配列番号1に記載のアミノ酸配列よりC末端が28アミノ酸短いタイプの可溶型ヒトCD14蛋白質、及び配列番号1に記載のアミノ酸配列の可溶型ヒトCD14蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、配列番号1に示したヒト高分子量のCD14蛋白質の329番目のバリンをコードする配列を翻訳終止コドン配列に変えた発現プラスミド (pM1653) および326番目のアスパラギン、328番目のグリシンをコードする配列をそれぞれグルタミン、バリンをコードする配列に変えることにより、GPIアンカリングされずに直接培養上清中に全長が分泌される発現プラスミド (pM1656) の構築を行った。

【0029】

前記のpUCH14P-4を鋳型にセンスプライマー: H0176S (CACGCCAGAACCTTGTGAGC) (配列番号2) とアンチセンスプライマー: H1148A-49k (GTCAGTGCACAGGCTGGCTATTA GCCGGAG) (配列番号3) あるいはセンスプライマー: H0176Sとアンチセンスプライマー: H1140A-M3 (GTCAGTGCACAGGCTGGGACCACAACGGATTGCATTGA) (配列番号4) を混合し、Ex Taqポリメラーゼ (宝酒造) を用いて94℃30秒、55℃30秒、72℃1分のPCR反応を30サイクル行いDNA断片を得た。これらのDNA断片をXhoIとApaLIでそれぞれ消化し、実施例3-(1) で作製したpM1650よりXhoIとHindIIIで消化し得られるDNA断片 (約5.8kb) およびApaLIとHindIIIで消化して得られるDNA断片 (約0.2kb) とライゲーションを行った。次にこれらのライゲーション反応液を大腸菌JM109 (宝酒造) に形質転換し、pM1653及びpM1656を定法によりクローニングした。

【0030】

次に配列番号1より41アミノ酸短いタイプの可溶型ヒトCD14蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、315番目のプロリンをコードする配列の後ろに翻訳終止コドン挿入した発現プラスミド (pM1657) を作製した。すなわち



、311番目のプロリンから315番目のプロリンまでの5アミノ酸をコードする配列に翻訳終止コドン (TAA、TAG) 及びHindIII サイト (AAGCTT) を結合したアンチセンスプライマー: H1101A-Hind (CCCAAGCTTCTATTAGAGATCGAGCACTCT) (配列番号5) を設計し、センスプライマー: H0176Sと共にpUCH14-Pを鋳型とし、ExTaqポリメラーゼ (宝酒造) を用いて94℃30秒、55℃30秒、72℃1分のPCR反応を30サイクル行いDNA断片を得た。このDNA断片をXhoIとHindIII でそれぞれ消化し、pM1650よりXhoIとHindIII で消化し得られるDNA断片 (約5.8kb) とライゲーションを行った。次にこのライゲーション反応液をJM109細胞に形質転換し、pM1657をクローニングした。

#### 【0031】

#### 実施例4 組換えヒトCD14蛋白質の調製

プラスミド (pM1650、pM1653、pM1656) を用いてDEAE-デキストラン法により組換えヒトCD14蛋白質を調製した。すなわち、COS-1細胞 (ATCC CRL1650) を培養し、細胞濃度が70%コンフルエントになった段階でトランスフェクションを行った。トランスフェクションはPromega社Transfection GUIDE記載の方法にしたが行い、60mm培養プレート当たり6μgのDNAを使用した。組換えヒトCD14蛋白質はトランスフェクションを行った次の日に培地を1%ウシ胎児血清を含むDMEM溶液に交換し、37℃で72時間培養することにより産生させた。培養上清を回収し、その上清を3000回転で遠心後、0.45μmメンブレンにより微粒子を除去した。

#### 【0032】

組換えヒトCD14蛋白質はSteinmanらにより作製された抗CD14モノクローナル抗体3C10 (American Type Culture Collectionより入手したATCC228-TIBハイブリドーマより調製した) をHiTrap NHS-activatedカラム (ファルマシア) に樹脂1mLあたり5mg結合し、調製したアフィニティーカラムを使用して精製し

た。まずカラムを0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化し、回収した培養上清をアプライした。アプライ後、0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)でカラムを洗浄し、次に0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH 2.5)で結合した組換えヒトCD14蛋白質を溶出した。溶出液のpHを中性付近に戻した後、凍結乾燥した。次に蒸留水で溶解し、0.076Mリン酸緩衝液(pH 6.4)で透析し、精製組換えヒトCD14蛋白質を得た。蛋白質濃度はBSAを標準品としてLowry法により算出した。

## 【0033】

実施例5 高分子量のCD14蛋白質特異的モノクローナル抗体の作製

(1) 抗CD14蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得

(1)-1 ラットモノクローナル抗体の作製

ペプチド13-KLHまたはペプチド15-KLH100 $\mu$ gを100 $\mu$ Lの生理食塩水に溶解し、フロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、Wistarラット8週齢メスの各後足フットパッドに100 $\mu$ Lずつ投与した。2週間後、腸骨リンパ節を摘出し細胞融合を行った。すなわち、リンパ節よりセルストレイナー(ファルコン)を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞(Sp2/O-Ag14)と混合後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈/著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがって細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。

## 【0034】

スクリーニングはペプチド15を直接プレートに固相化するELISA法により行った。まず、アミノプレート(白色、住友ベークライト)に0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で0.1mg/mLに希釈したSulfo-SMCC(PIERCE)を各ウェルに50 $\mu$ L添加し、室温で1時間静置した。次にプレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で5 $\mu$ g/mLに希釈したペプチド15を各ウェルに50 $\mu$ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応した。反応終了後イオン交換水で5回洗浄し、4mg/mLシステアミン、20%ブロッケーヌ(雪印乳業)、0.1%Tween 20を含む0.076M

リン酸緩衝液 (pH 6.4) (以下PBSと記載) を各ウェルに100  $\mu$ L添加し、室温で1時間静置しブロッキングを行った。得られたハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウェルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウェルに50  $\mu$ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。その結果に基づき、ペプチド15と反応する抗体を産生しているハイブリドーマを含むウェルを11ウェル選択した。次に選択したウェルが組換えヒトCD14蛋白質と反応するか確認を行った。まず0.01M炭酸緩衝液 (pH 9.5) により実施例3で精製した組換えヒトCD14蛋白質を1  $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb, NUNC) の各ウェルに50  $\mu$ L添加した。37℃で1時間反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBSを各ウェルに100  $\mu$ L添加しブロッキングを行った。次に選択したハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウェルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウェルに50  $\mu$ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450nmの吸光度を測定した。その結果、高分子量のCD14蛋白質と反応したハイブリドーマを含むウェル (F1033-3) を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、ペプチド15-KLHに対する反応性を指標としてスクリーニングを行った。すなわち、イムノプレート (Maxisorb, NUNC) にKLH、実施例2で作製したペプチド15-KLHをPBSで0.2  $\mu$ g/mLに希釈した溶液をそれぞれウェル当たり50  $\mu$ L添加し、45℃30分間反応し、固相化した。プレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.

5% BSAを含むPBSを各ウェルに100  $\mu$ L添加することによりブロッキングを行った。クローニング後のハイブリドーマの培養上清を各ウェルに添加し、室温で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウェルに50  $\mu$ L添加した。室温で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、KLHとは反応せず、ペプチド15-KLHとのみ反応する抗体産生ハイブリドーマを選択した。選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地(GIBCO)で培養後、Hybridoma-SFM培地(GIBCO)で培養し抗体を産生させ、Prosep-Gカラム(Bioprocessing)を用いて抗体を精製した。精製したF1033-3-1抗体のサブタイプはラットIgG2aであった。

#### 【0035】

同様にペプチド13-KLHを投与したラットハイブリドーマのスクリーニングを行い、CD14蛋白質と結合する抗体産生ハイブリドーマF1025-3-1を樹立した。ハイブリドーマをHybridoma-SFM培地(GIBCO)で培養し、同様に精製した。精製したF1025-3-1抗体のサブタイプはラットIgG1であった。

#### 【0036】

##### (1)-2 HRP標識抗体の作製

0.5mgのペルオキシダーゼ(東洋紡)を蒸留水に溶解し、蒸留水で溶解した100mMの過ヨウ素酸を添加し25℃で20分間反応した。反応終了後1.5%エチレングリコールを添加し25℃で10分間反応後1mM酢酸緩衝液(pH4.4)に対して透析した。精製F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体を10mM炭酸緩衝液(pH9.5)で透析し、0.5mgに対して1M炭酸緩衝液(pH9.5)を添加して活性化した0.5mgのペルオキシダー

ゼをそれぞれの抗体と等量に混合し25℃で2時間反応した。4 mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを添加しさらに2時間4℃で反応した。反応液をPBSに透析しペルオキシダーゼ標識抗体を得た。液量を測定し使用した抗体量より抗体濃度を算出した。

【0037】

### (1)-3 抗体の特異性の確認

作製したモノクローナル抗体 (F1033-3-1 及び F1025-3-1) の特異性を確認した。まず、投与したペプチドと特異的に結合するか確認するため、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) にKLH、ペプチド13-KLH、ペプチド15-KLHをPBSで0.5 µg/mLに希釈し、各ウェルに50 µLを添加し、45℃30分間反応させ抗原を固相化した。次に、イオン交換水で洗浄後、0.5% BSAを含むPBSを各ウェルに100 µL添加することによりブロッキングを行った。精製したF1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体をPBSで1 µg/mLに希釈し各ウェルに50 µL添加した。37℃で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウェルに50 µL添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに50 µL添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450 nmの吸光度を測定した。図1に示すようにF1033-3-1抗体はKLH、ペプチド13-KLHには反応せずペプチド15-KLHとのみ反応したことから、本抗体はペプチド15と特異的に反応することが明らかになった。同様にF1025-3-1抗体はKLH、ペプチド15-KLHには反応せずペプチド13-KLHとのみ反応したことから、本抗体はペプチド13と特異的に反応することが明らかになった。

【0038】

次に、各種組換えヒトCD14蛋白質を用いてF1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体の特異性を検討した。すなわち、イムノプレート (Max

i s o r b、NUNC) にC末端28アミノ酸を持たない可溶型CD14蛋白質 (pM1653より調製、以下CD14蛋白質タイプAと記載)、配列番号1に示した全長型の高分子量のCD14蛋白質 (pM1656より調製、以下CD14蛋白質タイプBと記載) 及びC末端41アミノ酸を持たない可溶型CD14蛋白質 (pM1657より調製、以下CD14蛋白質タイプCと記載) をPBSで  $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し各ウエルに  $50 \mu\text{L}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  で1時間反応させ組換えヒトCD14蛋白質を固相化した。イオン交換水で5回洗浄後、 $0.5\%$  BSAを含むPBSを各ウエルに  $100 \mu\text{L}$  添加することによりブロッキングを行った。F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体をPBSで  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、各ウエルに添加した。 $37^\circ\text{C}$  で1時間反応させた後、 $0.05\%$  Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を  $10\%$  ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウエルに  $50 \mu\text{L}$  添加した。 $37^\circ\text{C}$  で1時間反応後、同様に5回洗浄し  $0.01\%$  過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、 $0.5\text{M}$  硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で  $450\text{nm}$  の吸光度を測定した。図2に示すように高分子量のCD14蛋白質タイプA及びタイプBを認識するF1025-3-1抗体は両方ともに結合し、C末端41アミノ酸短い低分子量のCD14蛋白質タイプCには結合しなかったが、F1033-3-1抗体はタイプBの高分子量のCD14蛋白質とのみ結合した。以上より、F1033-3-1抗体は特異的にタイプBの高分子量のCD14蛋白質のみを認識し、F1025-3-1抗体はタイプA及びBの高分子量のCD14蛋白質のみを認識することが明らかになった。

#### 【0039】

#### 実施例6 F1033-3-1抗体のエピトープ解析

実施例5で作製したF1033-3-1抗体の認識する高分子量CD14蛋白質中のアミノ酸配列 (以下、エピトープと記載) を明らかにするため、SPOTs システム (CAMBRIDGE RESEARCH BIOCHEMICALS 社) を用いてエピトープマッピングを行った。すなわち、CAMBRIDGE

RESEARCH BIOCHEMICALS社のマニュアルに従い、CD14のアミノ酸配列（配列番号1）に基づき246番目のアミノ酸バリンより346番目のアミノ酸スレオニンまでを間を2アミノ酸づつずらしたペプチド鎖を合成し、10アミノ酸の長さを持つペプチド鎖46種類をメンブレン上に合成した。合成の終了したペプチド鎖の側鎖の脱保護を行い、指定の方法によりブロッキングを行った。次にF1033-3-1抗体をブロッキングバッファーで5 $\mu$ g/mLに希釈した溶液中でメンブレンを室温で6時間反応させた。反応終了後、メンブレンを0.05% tween 20/Tris buffer (pH 8.0) (T-TBS) で2回洗浄し、続けてブロッキングバッファーで500倍に希釈した $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識抗ラットIgG-F(ab')<sub>2</sub>抗体（American Qualex社）と4℃で一晩反応させた。反応液を捨て、T-TBSで2回、PBSで2回洗浄し $\beta$ -ガラクトシダーゼ用基質を加え、室温で約30分間反応させた。次にメンブレンをPBSで2回洗浄して反応を停止し、メンブレンの写真を撮影した。その結果、表1に示すように45及び46番目のペプチド鎖で強い発色が認められ、F1033-3-1抗体の認識するエピトープ配列は配列番号1に記載の配列の336番目から343番目の配列のSer Thr Leu Ser Val Gly Val Serからなる配列（配列番号6）であることが明らかになった。

【0040】

表 1

SPOT No.	アミノ酸配列	発色強度
44	Ala Cys Ala Arg Ser Thr Leu Ser Val Gly	-
45	Ala Arg <u>Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser</u>	++
46	<u>Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser</u> Gly Thr	+

【0041】

表1注 F1033-3-1抗体の認識するエピトープをSPOTsを用いて合成したペプチド鎖との反応性により、メンブレン上の発色強度で解析した結果を示したものである。下線を付したアミノ酸は反応したペプチド鎖の共通配列を示したものである。

【0042】

実施例7 抗CD14蛋白質モノクローナル抗体の作製

実施例4で作製した3C10アフィニティーカラムを用いて正常人血清中の可溶性CD14蛋白質を精製し、投与抗原とした。タンパク濃度はBSAを標準品にしてタンパク定量(BIORDAD)を行い、濃度を算出した。

免疫はラットとマウスを用いて行い、ラットについてはフットパッドに抗原100 $\mu$ gを、マウスについては腹腔に抗原20 $\mu$ gをフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合して投与した。ラットについては投与2週間後、実施例5で記載した方法により細胞融合を行い、HAT培地によりハイブリドーマを選択した。次に、ELISA法を用いて抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングした。すなわち、精製可溶性CD14蛋白質を0.01M炭酸緩衝液(pH9.5)にて1 $\mu$ g/mLに希釈し50 $\mu$ Lをイムノプレート(Maxisorb、NUNC)の各ウェルに分注後、37℃1時間反応させ、抗原を固相化した。プレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.5%BSA/PBSを100 $\mu$ L添加することによりブロッキングを行った。ブロッキング液を捨て、ハイブリドーマの培養上清を50 $\mu$ L添加し37℃で1時間反応させた。次に、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄後、10%ウサギ血清を含むPBSでペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を1000倍に希釈し、各ウェルに100 $\mu$ L添加した。37℃1時間反応後、洗浄し、0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに50 $\mu$ L添加し、10分後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し450nmの吸光度を測定した。その結果より、固相化した可溶性CD14蛋白質と反応した抗体を産生するハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、同様にスクリーニングを行い、抗CD14蛋白質モノクローナル抗体



25種類を得た。

【0043】

マウスについては初回投与2週間後に抗原 $20\mu\text{g}$ を生食に溶解し、フロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合後、腹腔に投与した。1週間後、抗体価の上昇を上記記載のELISA法により確認した。マウスの腹腔に抗原 $100\mu\text{g}$ を投与し最終投与を行い、3日後、脾臓を摘出した。脾臓よりリンパ球を分離し、ミエローマ細胞(P3 $\times$ 63-Ag. 8. U. 1)と10:1で混合しポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを上記記載のELISA法により行った。固相化した可溶性CD14蛋白質と反応したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、10日後同様にスクリーニングを行い、抗CD14蛋白質モノクローナル抗体33種類を得た。

得られた抗体を実施例5に記載の方法により培養し、同様に精製抗体を作製した。

【0044】

実施例8 サンドイッチELISA系の作製

(1) 組み合わせが可能な抗体の検索

F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体とサンドイッチELISAを作製可能な抗体を検索するため、実施例7で作製した各精製抗体を $10\mu\text{g}/\text{mL}$ にPBSで希釈しイムノプレート(Maxisorb、NUNC)の各ウェルに $50\mu\text{L}$ 添加し $45^{\circ}\text{C}$ 30分間反応し抗体を固相化した。イオン交換水で洗浄後、0.5%BSAを含むPBSを各ウェルに $100\mu\text{L}$ 添加することによりブロッキングを行った。ブロッキング液を廃棄し、次に0.1%BSA/PBSで精製可溶性CD14蛋白質を $100\text{ng}/\text{mL}$ に希釈したものを $50\mu\text{L}$ 添加した。ブランクには0.1%BSA/PBSを使用した。 $25^{\circ}\text{C}$ で1時間反応後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識F1033-3-1抗体またはペルオキシダーゼ標識F1025-3-1抗体を10%ラット血清を含むPBSで $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し各ウェルに $50\mu\text{L}$

L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、F1033-3-1抗体とサンドイッチEIA系が作製可能な抗体としてF1023-1-1(ラットIgG1)、F1031-7-1(マウスIgG1)、3C10抗体が選択された。同様にF1025-3-1抗体とサンドイッチEIA系が作製可能な抗体としてF1023-1-1(ラットIgG1)、3C10抗体が選択された。

#### 【0045】

##### (2) サンドイッチELISA系の確立

精製F1023-1-1抗体を0.01M 炭酸緩衝液(pH9.0)で10μg/mLに希釈し、イムノプレート(Maxisorb、NUNC)の各ウェルに50μL添加した。25℃で1時間反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7.4)(以下PBS(-)と記載)を各ウェルに100μL添加することによりブロッキングを行った。高分子量のCD14蛋白質標準品を1%CD14吸収血清、(可溶型CD14蛋白質を3C10抗体を結合したカラムにより除去した血清)、0.1%BSAを含むPBS(-)で希釈し、0から100ng/mLの希釈系列を作成した。検体は0.1%BSAを含むPBS(-)で100倍に希釈した。標準品希釈系列または希釈した検体をウェル当たり25μL添加し、さらに希釈液を25μL添加した後、25℃で1時間反応させた。次に、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、10%ラット血清、0.1%Tween20を含むPBS(-)で0.5~2μg/mLに希釈したペルオキシダーゼ標識F1033-3-1抗体またはペルオキシダーゼ標識F1033-3-1抗体を各ウェルに50μL添加した。25℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定し、標準曲線を作成した。

。図3及び図4に作成した標準曲線を示した。測定感度はそれぞれ $0.5 \text{ ng/mL}$  (ブランク+3SD)であり、高感度で簡便な測定系が実現された。また、作成したサンドイッチELISA系の特異性を確認するため上記の系に実施例4で調製した組換えヒトCD14蛋白質を用いて測定を行った。その結果、F1033-3-1抗体を用いた測定系は図5に示すようにタイプBの高分子量のCD14蛋白質でのみ標準曲線が作成され、タイプAの高分子量のCD14蛋白質とは反応せず、本系の特異性が確認された。また、図6に示すようにF1025-3-1抗体を用いた測定系ではタイプA、Bの高分子量のCD14蛋白質で標準曲線が作成できた。

## 【0046】

## 実施例9 血中高分子量のCD14蛋白質の測定

正常人40例(男性20例、女性20例)、敗血症患者10例について血清測定を行った。F1023-1-1/F1033-3-1抗体を用いた測定系の測定結果を図7に示した。血清中の高分子量CD14蛋白質の濃度は正常人で $0.55 \sim 3.41 \mu\text{g/mL}$ に分布し、その平均値は正常人男子では $1.99 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$  (平均値 $\pm$ SD)、正常人女子では $1.69 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$ であった。敗血症患者は $3.96 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ に分布し、平均値は $5.36 \pm 1.81 \mu\text{g/mL}$ であった。敗血症患者の測定値と正常人との間に $P < 0.001$ で有意差が認められた。また、F1023-1-1/F1025-3-1抗体を用いた測定系の測定結果を図8に示した。血清中の高分子量CD14蛋白質の濃度は正常人で $0.45 \sim 2.07 \mu\text{g/mL}$ に分布し、その平均値は正常人男子では $1.18 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ 、正常人女子では $1.07 \pm 0.40 \mu\text{g/mL}$ であった。敗血症患者は $2.02 \sim 5.28 \mu\text{g/mL}$ に分布し、平均値は $2.75 \pm 0.97 \mu\text{g/mL}$ であった。敗血症患者の測定値と正常人との間に $P < 0.001$ で有意差が認められた。本結果より、本発明の抗体を用いる高分子量のCD14蛋白質測定系は敗血症患者の新規マーカーとなりえることが明らかになった。

## 【0047】

## 【発明の効果】

本発明により、高分子量のCD14蛋白質の抗体が得られた。また該抗体を用いることにより、高分子量のCD14蛋白質を、高感度、高精度及び高い特異性で検出または定量することが簡便に行なえるようになった。本発明により、敗血症、関節リウマチ等の可溶型CD14蛋白質または高分子量のCD14蛋白質が指標となる疾患を簡便に診断することが可能になった。

---

【0 0 4 8】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

~~<120> Fractional analysis of soluble CD14 proteins~~

---

<130> MD0504

<160> 6

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val  
1 5 10 15  
Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys  
20 25 30  
Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu  
35 40 45  
Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala  
50 55 60  
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala  
65 70 75 80  
Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr  
85 90 95

Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr

100

105

110

Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu

115

120

125

Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu

130

135

140

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln

145

150

155

160

Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala

165

170

175

L u Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly

180

185

190

L u Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu

195

200

205

Ala Leu Arg Asn Thr Gly Ile Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala

210

215

220

Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn

225

230

235

240

S r Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser

245

250

255

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val

260

265

270

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn

275

280

285

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn

290

295

300

Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro

305

310

315

320

His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pr Ala Cys Ala Arg Ser

325 330 335  
Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala

340 345 350  
Arg Gly Phe Ala

355

【 0 0 4 9 】

---

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> synthesiyed DNA(senseprimer:H0176S)

<400> 2

cacgccagaa ccttgtgagc

【 0 0 5 0 】

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> synthesiyed DNA(senseprimer:H1148A-49k)

<400> 3

gtcagtgcac aggctggcta ttagccggag

【 0 0 5 1 】

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> synthesiyed DNA(antisenseprimer:H1140A-M3)

<400> 4

gtcagtgcac aggctgggac cacaacggat tgcattga

【 0 0 5 2 】

<210> 5

<211> 30

---

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> synthesiyed DNA(antisenseprimer:H1101A-Hind)

<400> 5

cccaagcttc tattagagat cgagcactct

【 0 0 5 3 】

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 6

Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser

【図面の簡単な説明】

【図 1】 モノクローナル抗体 F 1 0 3 3 - 3 - 1 及び F 1 0 2 5 - 3 - 1 の特異性を、免疫原として用いたペプチドキャリア (KLH、ペプチド 1 3、ペプチド 1 5) との反応性により、ELISA 法で測定した結果を示したグラフである。

【図 2】 モノクローナル抗体 (F 1 0 3 3 - 3 - 1 抗体及び F 1 0 2 5 - 3 - 1 抗体) の特異性を、組換えヒト CD 1 4 蛋白質との反応性により、ELISA 法で測定した結果を示したグラフである。PBS、タイプ A、タイプ B 及タイプ C はそれぞれ抗原なし、2 8 アミノ酸短いタイプの高分子量の CD 1 4 蛋白質



、全長型の高分子量のCD14蛋白質及び41アミノ酸短いタイプの高分子量のCD14蛋白質に対する反応性を示した結果である。

【図3】 モノクローナル抗体F1033-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系の特異性を、組換えヒトCD14蛋白質との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したグラフである。タイプA、タイプBは28アミノ酸短い高分子量のCD14蛋白質、全長型の高分子量のCD14蛋白質に対する反応性を示した結果である。

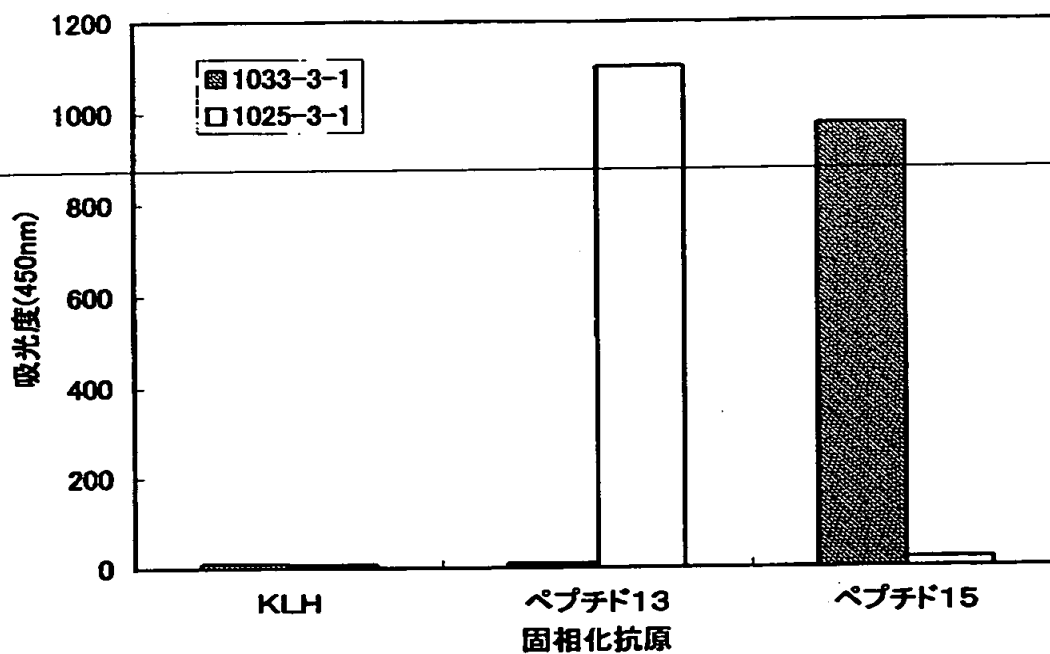
【図4】 モノクローナル抗体F1025-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系の特異性を、組換えヒトCD14蛋白質との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したグラフである。タイプA、タイプBは28アミノ酸短い高分子量のCD14蛋白質、全長型の高分子量のCD14蛋白質に対する反応性を示した結果である。

【図5】 モノクローナル抗体F1033-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系を用いて正常人（男）、正常人（女）、敗血症患者を測定した血清測定の結果を示したグラフである。

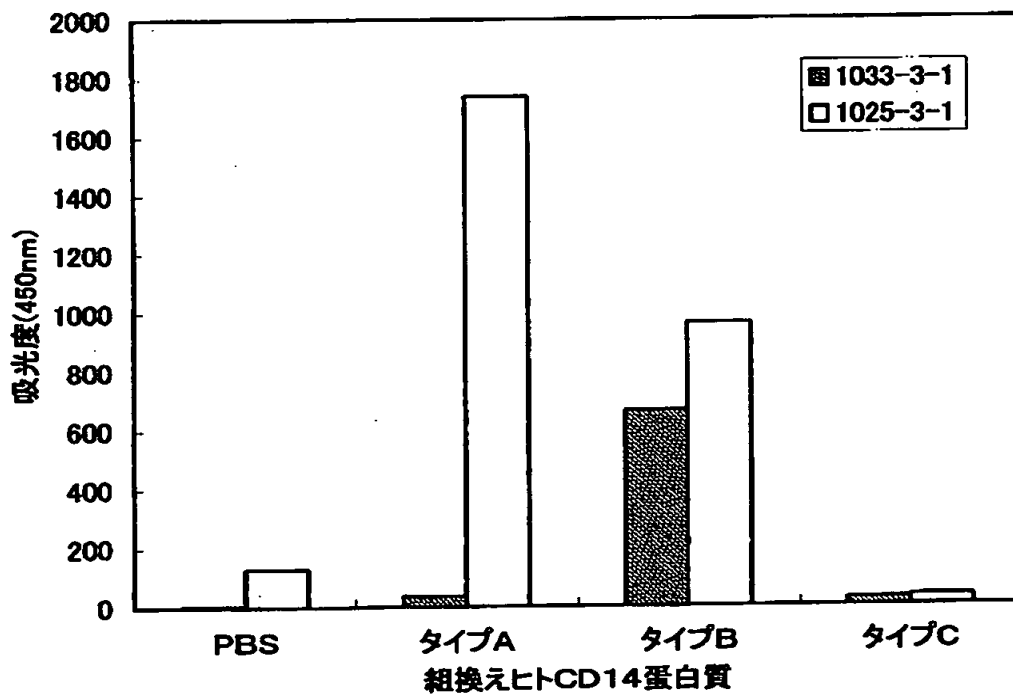
【図6】 モノクローナル抗体F1025-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系を用いて正常人（男）、正常人（女）、敗血症患者を測定した血清測定の結果を示したグラフである。

【書類名】 図面

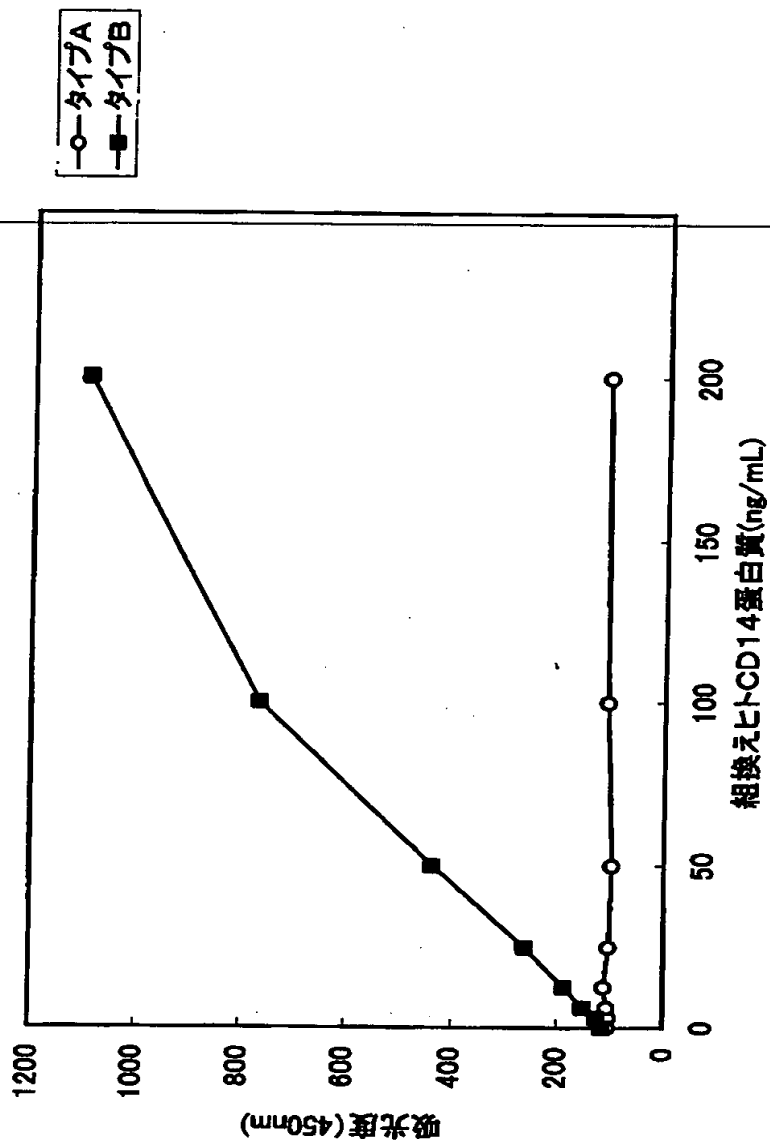
【図 1】



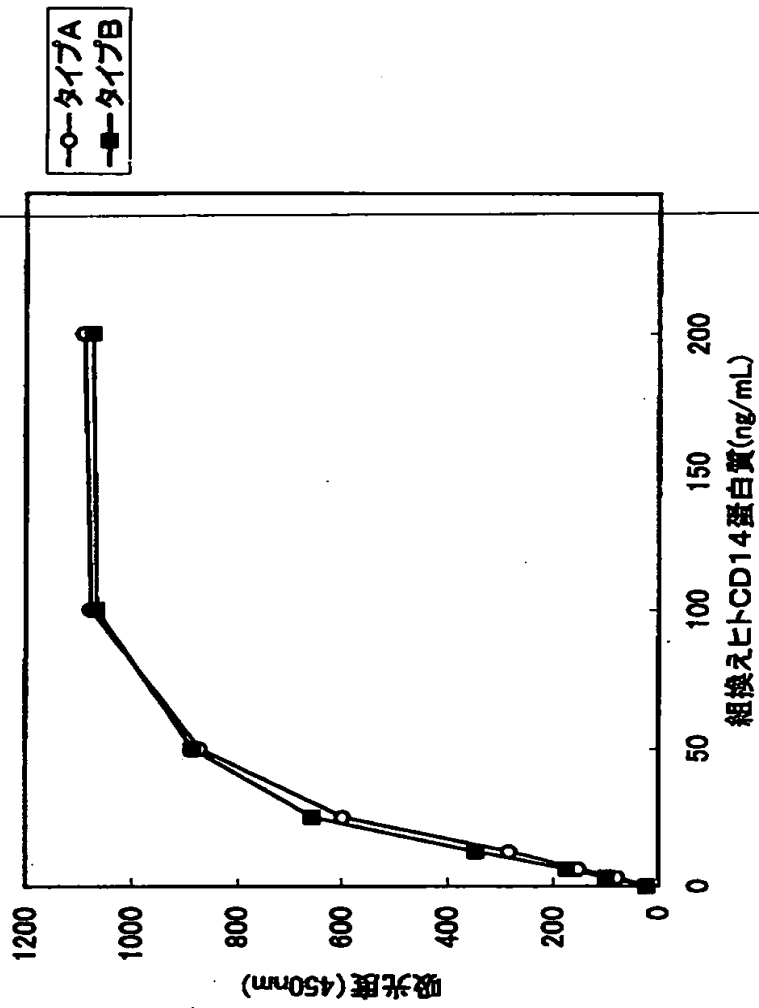
【図 2】



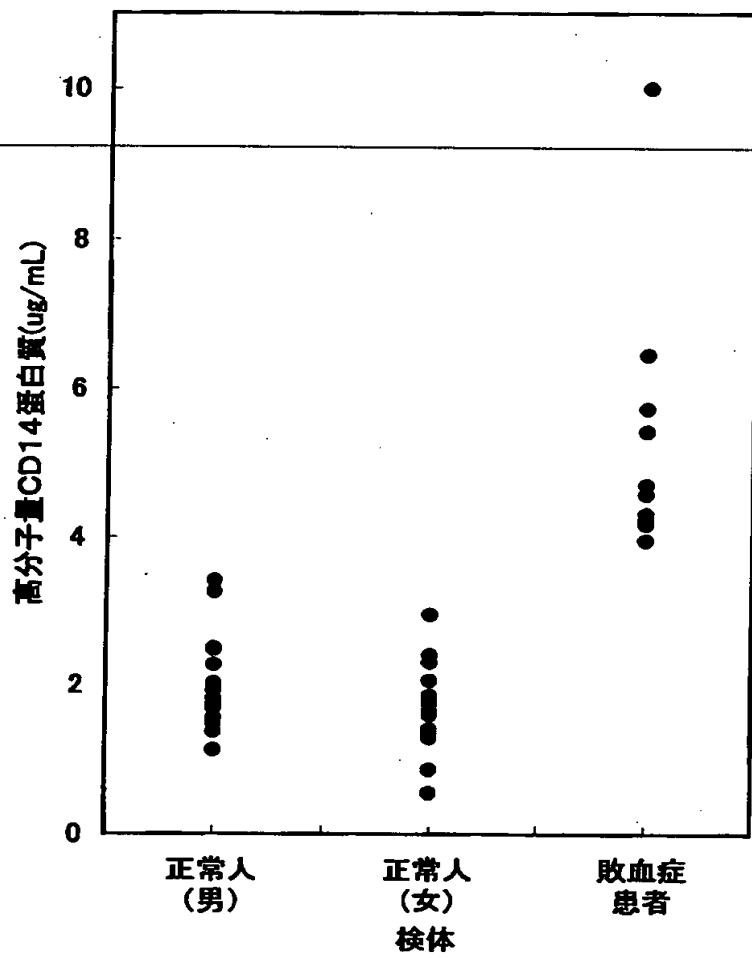
【図 3】



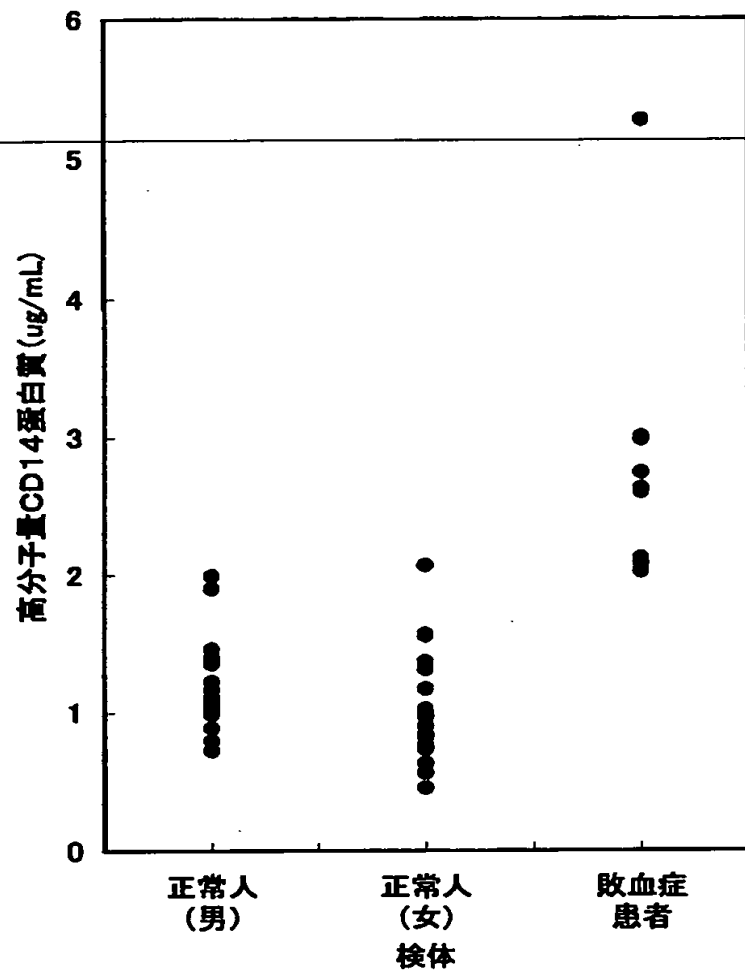
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高分子量のCD 1 4 蛋白質を高感度、高精度及び高い特異性で検出または定量を簡便に行なえる抗体を提供する。また、敗血症、関節リウマチ等の疾患を簡便に診断する方法を提供する。

【解決手段】 高分子量のCD 1 4 蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD 1 4 蛋白質には結合しない抗体。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000181147]

---

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区四谷1丁目7番地
氏 名	持田製薬株式会社